

1
AP20 Rec'd PCT/PTO 19 APR 2006METHODE D'INDUCTION D'UNE ACTIVITE ARNi SPECIFIQUE DANS DES
CELLULES ET ACIDES NUCLEIQUES POUR SA MISE EN ŒUVRE

5 L'invention concerne le domaine de la biologie et plus particulièrement la préparation d'oligonucléotides, double brin, destinés à être utilisés dans un processus d'interférence ARN (RNAi ou ARNi) dans le but d'induire la dégradation d'un ARN cible.

10 L'interférence ARN désignée aussi « RNAi » ou encore co-suppression, a été mise en évidence dans les plantes, où il a été observé que l'introduction d'un long ARN double brin, correspondant à un gène, induit la répression spécifique et efficace de l'expression du gène ciblé. Le mécanisme de cette interférence comporte la dégradation de l'ARN double brin en courts duplex d'oligonucléotides d'environ 20 à 22 nucléotides appelés siRNAs.

15 L'interférence ARN a maintenant été appliquée aux mammifères pour inhiber spécifiquement l'expression des gènes pour des applications en génétique fonctionnelle. En effet, les siRNAs permettent d'identifier la fonction des gènes mis en évidence par le séquençage du génome humain, soit dans des modèles de culture cellulaire, soit dans des modèles animaux en particulier chez la souris. L'interférence ARN est aussi utile dans le domaine
20 thérapeutique pour le traitement ou la prévention de cancers, de maladies infectieuses et plus généralement de maladies mettant en jeu un gène hétérologue ou homologue muté (Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001a). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature 411, 494-498 ;
25 Elbashir, S. M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001b). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in Drosophila melanogaster embryo lysate. Embo J 20, 6877-6888).

30 Les siRNAs sont de courtes séquences d'ARN double brin, qui peuvent être introduites dans les cellules sous forme d'oligonucléotides synthétiques ou sous forme de vecteurs permettant l'expression de ces siRNAs. Dans cette dernière approche, le siRNA est synthétisé sous la forme d'un

BEST AVAILABLE COPY

précurseur qui est un shRNA (short hairpin RNA), formé d'une "tige boucle" dans laquelle la tige représente le siRNA et la boucle une séquence quelconque qui sera dégradée par les RNAases cellulaires, ce qui va donner naissance au siRNA mature.

5 La mise en œuvre de vecteurs d'expression de siRNAs présente de nombreux avantages, en particulier pour les applications de génétique fonctionnelle. Elle permet d'exprimer l'ARN double brin de manière stable dans les cellules, et donc d'inhiber plus facilement l'expression des protéines à longue demi-vie. En effet, les siRNAs synthétiques ont une durée de demi-vie
10 de 3 jours dans les cellules de mammifères. De plus, les siRNA sont dilués au cours des divisions cellulaires.

Elle permet aussi d'analyser des effets à long terme. Par contre, elle nécessite d'établir des lignées exprimant la construction de manière stable, ce qui présente plusieurs inconvénients. En particulier, il faut comparer des lignées
15 stables entre elles, ce qui est en général difficile d'interprétation parce que les lignées cellulaires dérivent. D'autre part, il est impossible d'étudier les protéines indispensables pour la cellule, puisque leur inhibition bloquera la prolifération des cellules et empêchera donc l'établissement de la lignée stable. Il est donc indispensable de pouvoir induire l'activité du siRNA. On entend par induire
20 l'activité du siRNA pouvoir bloquer et débloquent son activité à volonté. On entend par activité du siRNA sa capacité à reconnaître et à induire la dégradation de son ARN cible.

Il est décrit dans l'art antérieur un vecteur permettant l'expression stable et inductible de siRNA. Ce système est basé sur l'inhibition de la
25 transcription du précurseur du siRNA. En effet, le vecteur, dérivé du vecteur pSUPER (Brummelkamp T. R et al., www.sciencexpress.org/21 March 2002/page 1/10.1126/science.1068999), contient une séquence connue, "l'opérateur tetracycline" ("opérateur TET"), positionnée entre le promoteur dirigeant la transcription du siRNA et la séquence codant ledit siRNA. En
30 présence de la protéine "répresseur TET", celle-ci se fixe sur "l'opérateur TET" et bloque ainsi la transcription du siRNA. En présence de doxycycline, celle-ci

inhibe la fixation de la protéine "répresseur TET", sur "l'opérateur TET" et permet donc la transcription du siRNA. Ce système d'expression engendre un bruit de fond d'activité relativement élevé.

De plus, les systèmes inductibles basés sur les promoteurs
5 fonctionnent très mal dans les vecteurs viraux, parce que les promoteurs viraux prennent le pas sur les promoteurs inductibles et le bruit de fond est très élevé.

L'invention vise précisément à palier ces inconvénients en offrant un système permettant d'induire à volonté l'activité d'un siRNA.

Ce but est atteint par la présente invention grâce à l'emploi du couple
10 protéine TAT-séquence ARN TAR pour bloquer l'activité d'un siRNA dans des cellules de mammifères.

Le principe de l'invention est basé sur l'interaction TAT/TAR. En effet, le siRNA doit être reconnu dans la cellule par un complexe protéique, appelé complexe RISC (RNA-Induced Silencing Complex), qui va lui faire subir
15 une étape de maturation et l'utiliser comme guide pour reconnaître et dégrader le mRNA cible. La protéine TAT peut être utilisée pour bloquer cette dernière étape.

La protéine TAT du VIH joue un rôle crucial dans la réplication virale. En effet, en tant que facteur de transcription, TAT régule la vitesse de
20 réplication du virus. TAT est une protéine sécrétée capable de diffuser dans les cellules non-infectées et de préparer un environnement propice à l'infection virale. La protéine TAT existe sous deux formes (71 et 101 acides aminés) codées par deux exons séparés par le gène *env*. TAT exerce sa fonction d'activateur du promoteur du VIH en se liant à la séquence d'ARN TAR
25 présente en 5' de tous les ARN du VIH.

La liaison de TAT et de ses co-activateurs transcriptionnels cellulaires à l'ARN TAR va stimuler l'élongation de la transcription en augmentant la processivité de l'ARN polymérase II.

La présence d'ARNs double brins dans une cellule représente un
30 signal : il met en jeu une RNase III nommée Dicer. Cette ribonucléase coupe les longs ARN double brin en petits fragments d'ARN double brin, les siRNAs, de

taille et de structure précises, en général 21 à 23 nucléotides. Les siRNAs duplexes s'associent ensuite avec des protéines pour former un complexe nommé RISC (pour « *RNA-Induced Silencing Complex* »). RISC est donc un complexe ribonucléoprotéique contenant une molécule de siRNA associée à des protéines appartenant à la famille Argonaute. RISC guide, grâce à l'extrémité 5'Phosphate d'un siRNA simple brin, les petits siRNAs pour la reconnaissance spécifique de la séquence de l'ARN messenger cible et catalyse son clivage ; cette réaction a lieu dans le cytoplasme. Cela aboutit à l'inhibition de la traduction et ainsi à l'inhibition de l'expression du gène cible.

10 Selon l'invention, la boucle du précurseur du siRNA (shRNA), normalement constituée de séquence quelconque, est remplacée par une séquence nucléotidique codant pour au moins une séquence en nucléotides contenue dans la séquence TAR, minimale et suffisante pour être reconnue par la protéine TAT.

15 Ladite séquence référencée dans la liste de séquences soumise en annexe sous le numéro SEQ ID N° 1, est composée de 11 nucléotides et présente l'enchaînement suivant : ATCTGAGCTCT (ou AUCUGAGCUCU sous sa forme ARN).

20 Il est également possible d'utiliser selon l'invention, une séquence codant pour la totalité de la séquence TAR sauvage ou mutée ou tout fragment de celle-ci contenant ladite séquence en nucléotides, minimale non-mutée ci-dessus décrite. Cette séquence (ADN ou ARN) est dénommée par ailleurs dans le texte séquence séparatrice.

25 La séquence séparatrice utilisée selon l'invention peut être naturelle ou synthétique.

Ainsi, en présence de la protéine TAT, celle-ci interagit avec la boucle TAR sur le shRNA, et l'interaction du siRNA avec le complexe protéique de maturation (complexe RISC) ne peut se réaliser et le siRNA ne subit pas les étapes de maturation induites par ledit complexe et reste donc inactif c'est-à-dire sous la forme shRNA.

30 En l'absence de la protéine TAT, la boucle TAR du shRNA est

dégradée et le siRNA résultant est accessible au complexe de maturation RISC et le processus de dégradation de l'ARN cible par l'ARNi peut ainsi s'effectuer.

L'invention a donc pour objet une méthode d'induction de l'activité d'un ARNi dans des cellules dans laquelle :

- 5 - on introduit dans des cellules eucaryotes la protéine TAT et un acide nucléique codant pour les séquences sens et antisens d'un ARNi d'intérêt, lesdites séquences sens et antisens étant séparées par une séquence nucléotidique comprenant au moins la séquence référencée sous le numéro SEQ ID N° 1 dans la
10 liste de séquences fournie en annexe, codant pour au moins une séquence en nucléotides contenue dans la séquence TAR, minimale et suffisante pour être reconnue par la protéine TAT, dans des conditions où l'acide nucléique est transcrit en ARN, ladite séquence séparatrice transcrite et la protéine TAT formant
15 un complexe inhibant l'activité de l'ARNi d'intérêt ;
- on induit l'activité de l'ARNi en retirant la protéine TAT.

La séquence séparatrice peut être constituée par toute séquence nucléotidique pourvu qu'elle comprenne au moins la séquence SEQ ID N°1. Avantageusement la séquence séparatrice est constituée d'une séquence
20 codant pour la séquence TAR complète, sauvage ou mutée, ou d'un fragment de celle-ci comprenant une séquence codant pour la séquence SEQ ID N°1.

Selon une forme particulière de mise en œuvre de la méthode de l'invention, ledit acide nucléique codant pour les séquences comprenant les séquences sens et antisens d'un ARNi d'intérêt séparées par la séquence
25 séparatrice ci-dessus décrite peut être introduite dans la cellule sous la forme d'un vecteur d'expression, particulièrement sous la forme d'un plasmide ou d'un vecteur viral.

Dans cette forme de réalisation, l'ARNi d'intérêt sera transcrit à partir du vecteur codant pour le shRNA qui va donner naissance au siRNA après
30 clivage de la séquence séparatrice simple brin. Ainsi, le vecteur comprend au moins une séquence en nucléotides codant pour les séquences sens et

antisens du siRNA séparées par une séquence nucléotidique comprenant au moins la séquence référencée sous le numéro SEQ ID N° 1, sous la dépendance d'un promoteur de transcription.

Ledit acide nucléique décrit ci-dessus permet la mise en œuvre de la
5 méthode d'induction de l'activité d'un ARNi dans des cellules eucaryotes.

Le vecteur peut en outre comprendre un gène de résistance à un antibiotique. Avantageusement selon l'invention, le gène de résistance à un antibiotique est un gène de résistance à la néomycine.

La présence d'un gène de résistance à un antibiotique, comme la
10 néomycine, permet de sélectionner les cellules transfectées.

Selon l'invention, lorsque les cellules sont des cellules en culture, la protéine TAT peut être introduite dans lesdites cellules par simple culture des cellules dans un milieu comprenant la protéine TAT.

En effet, un avantage de la présente invention réside dans le fait que
15 la protéine TAT pénètre spontanément dans les cellules lorsque celles-ci sont cultivées dans un milieu de culture contenant la protéine TAT. Il est donc facile de bloquer l'action du siRNA, comprenant la séquence séparatrice TAR telle que décrite précédemment, en cultivant les cellules contenant le siRNA dans un milieu de culture contenant de la protéine TAT, et de stimuler l'activité de l'ARNi
20 en cultivant lesdites cellules dans un milieu de culture sans protéine TAT, ce qui conduira à la dégradation de l'ARN cible par le l'ARNi.

Dans ces conditions le milieu de culture peut contenir la protéine TAT en une concentration comprise entre 0,1 μ g/ml et 5 μ g/ml préférentiellement 0,5 μ g/ml et 1,5 μ g/ml et très préférentiellement 1 μ g/ml.

La protéine TAT peut aussi être introduite dans la cellule sous la
25 forme d'un vecteur d'expression inductible comprenant une séquence nucléotidique codant pour la protéine TAT. Dans ce cas, l'expression de la protéine pourra être induite ce qui aura comme conséquence d'inhiber l'activité de l'ARNi et donc de bloquer la dégradation de l'ARN cible par l'ARNi. La
30 dégradation de l'ARN cible par l'ARNi pourra alors être induite lorsque la

synthèse de la protéine TAT sera elle-même bloquée.

Selon l'invention, les cellules transfectées avec l'acide nucléique selon l'invention sont des cellules de mammifères. La méthode s'applique aussi bien à la transfection de cellules en culture que directement chez l'animal.

5 L'invention permet d'analyser de manière fiable les gènes, particulièrement les gènes humains d'un point de vue fonctionnel, dans des cellules en culture ou dans des animaux, en particulier dans des souris.

L'invention se rapporte encore à une cellule ou une lignée de cellules dans laquelle un acide nucléique selon l'invention, tel que décrit précédemment
10 a été introduit.

L'invention se rapporte aussi aux animaux comprenant des cellules dans lesquelles l'acide nucléique selon l'invention tel que décrit précédemment a été introduit.

L'invention a enfin pour objet des compositions, notamment
15 pharmaceutiques, comprenant comme substance active au moins un acide nucléique selon l'invention tel que décrit précédemment ou des cellules contenant ledit acide nucléique, telles que décrites précédemment, éventuellement associées dans la composition à un excipient compatible.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront des
20 exemples qui suivent et dans lesquels il sera fait référence au dessin en annexe dans lequel la figure 1 représente l'inhibition du marqueur GFP par l'ARNi.

Exemple 1 : construction du plasmide pTATOF-siRNAGFP codant pour un ARNi dont la cible est l'ARN messager codant pour la protéine fluorescente verte (Green Fluorescent Protein : GFP) :

25 Ce plasmide est construit à partir du plasmide pSUPER, permettant l'expression constitutive de siRNA et décrit par Brummelkamp et al.

La séquence d'ADN (oligonucléotide ADN synthétique synthétisé à façon), contenant dans l'ordre les séquences SEQ ID N°2 (codant pour le siRNA sens)-SEQ ID N°1 (codant pour la séquence séparatrice)-SEQ ID N°3
30 (codant pour le siRNA anti-sens) est introduite immédiatement en aval du

promoteur H1 du plasmide pSuper aux sites Bgl II en 5', et Hind III en 3'. On obtient ainsi le vecteur d'expression pTATOF-siRNAGFP.

(SEQ ID NO. 2) codant pour le siRNA sens :
5' GCAAGCTGACCCTGAAGTTC 3'
3' CGTTCGACTGGGACTTCAAG 5'
séquence codant pour la séquence séparatrice (SEQ ID NO. 1)
5' ATCTGAGCTCT 3'
3' TAGACTCGAGA 5'
(SEQ ID NO. 3) codant pour le siRNA anti-sens :
5' GAACTTCAGGGTCAGCTTGC 3'
3' CTTGAAGTCCCAGTCGAACG 5'

- Ainsi, les séquences codant pour les siRNA sens et anti-sens sont
- 5 séparées par une boucle TAR minimale, codée par la séquence séparatrice nommée SEQ ID NO.1, codant pour la séquence minimale reconnue par la protéine TAT (SEQ ID NO. 4).

Codant pour le SiRNA :
5'
10 GCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGAGCTCTGAACTTCAGGGTCAGCTTGC 3'
CGTTCGACTGGGACTTCAAGTAGACTCGAGACTTGAAGTCCCAGTCGAACG
3'
Codant pour le SiRNA complémentaire :
5'

- 15 Exemple 2 : inhibition de l'expression de la GFP par le siRNAGFP exprimé par le vecteur de l'exemple 1 :

- Des cellules de mammifères COS-7 sont transfectées avec du polyfect (Qiagen) avec 4 µg de vecteurs d'expression des siRNA (pTATOFsiRNAGFP, partie A, ou pSuper siRNAGFP sans boucle TAR, partie
- 20 B), ainsi qu'un vecteur d'expression de la Green Fluorescent Protein ou GFP (500 ng). Soixante heures après la transfection, un western blot a été réalisé à partir des extraits totaux en utilisant un anticorps dirigé contre la GFP (Santa cruz) ou la tubuline cellulaire (Sigma) afin d'évaluer la quantité de protéines utilisée pour ce test.

- 25 Les cellules sont cultivées dans du milieu DMEM (Gibco) contenant 10% de sérum de veau foetal en présence (wt) ou en l'absence (-) d'un vecteur

d'expression (0,5 µg) de la protéine TAT ou de ses mutants, co-transfectés (Bres V, et al. *Nat Cell Biol.* 2003 Aug;5(8):754-61).

Un témoin est réalisé avec des cellules n'ayant pas reçu le vecteur d'expression des siRNA (pTATOF-siRNAGFP ou pSuper siRNAGFP), cultivées en l'absence de protéine TAT. De même des témoins sont réalisés avec un vecteur d'expression de la protéine TAT mutée (incapable de lier la séquence TAR) en présence du vecteur d'expression des siRNA (pTATOF-siRNAGFP ou pSuper siRNAGFP).

La Figure 1 montre les résultats de cette expérience :

Partie A :

En l'absence de protéine TAT et de vecteur pTATOF-siRNAGFP, la GFP est présente dans les cellules (colonne 1).

En l'absence de protéine TAT et en présence du vecteur pTATOF-siRNAGFP, la GFP est dégradée (colonne 2).

En présence de protéine TAT sauvage et du vecteur pTATOF-siRNAGFP, la GFP est présente dans les cellules (colonne 3) en quantité comparable à celle présente dans les cellules n'ayant pas reçu de protéine TAT ni de vecteur pTATOF-siRNAGFP (colonne 1), et n'est donc pas dégradée.

En présence de protéine TAT mutée et du vecteur pTATOF-siRNAGFP, la GFP est dégradée dans les cellules (colonne 4 et 5).

Partie B :

En l'absence de protéine TAT et de vecteur pSupersiRNAGFP (sans séquence TAR), la GFP est présente dans les cellules (colonne 1).

En l'absence de protéine TAT et en présence du vecteur pSupersiRNAGFP, la GFP est dégradée (colonne 2).

En présence de protéine TAT sauvage ou mutée et du vecteur pSupersiRNAGFP,) la GFP est dégradée dans les cellules (colonne 1, 4 et 5).

Ceci démontre que la protéine TAT sauvage reconnaît la séquence séparatrice intercalée entre les séquences sens et antisens de siRNA et bloque

son activité alors qu'une protéine TAT mutée, incapable de reconnaître la séquence séparatrice n'a pas d'effet sur le siRNA qui apparaît parfaitement fonctionnel.

REVENDICATIONS

1) Méthode d'induction de l'activité d'un ARNi dans des cellules dans laquelle :

- 5 - on introduit dans des cellules eucaryotes la protéine TAT et un acide nucléique codant pour les séquences sens et antisens d'un ARNi d'intérêt, lesdites séquences sens et antisens étant séparées par une séquence nucléotidique (séquence séparatrice) comprenant au moins la séquence référencée sous le numéro SEQ ID N° 1 dans
- 10 la liste de séquence fournie en annexe, codant pour au moins une séquence en nucléotides contenue dans la séquence TAR, minimale et suffisante pour être reconnue par la protéine TAT, dans des conditions où l'acide nucléique est transcrit en ARN, ladite séquence séparatrice transcrite et la protéine TAT formant un complexe
- 15 inhibant l'activité de l'ARNi d'intérêt ;
- on induit l'activité de l'ARNi en retirant la protéine TAT.

2) Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit acide nucléique comprenant les séquences codant pour les séquences sens et antisens d'un ARNi d'intérêt séparées par la séquence séparatrice est introduite

20 dans la cellule sous la forme d'un vecteur.

3) Méthode selon la revendication 2, caractérisée en ce que ledit vecteur est un plasmide ou un vecteur viral.

4) Méthode selon l'une des revendications 2 ou 3, caractérisée en ce que ledit acide nucléique est sous la dépendance d'un promoteur de

25 transcription.

5) Méthode selon l'une quelconque des revendications 2 à 4, caractérisée en ce que ledit acide nucléique comporte en outre un gène de résistance à un antibiotique.

6) Méthode selon la revendication 5, caractérisée en ce que le gène

30 de résistance à un antibiotique est un gène de résistance à la néomycine.

7) Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que les cellules transfectées sont des cellules de mammifères.

5 8) Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'on introduit la protéine TAT dans les cellules eucaryotes par cultures desdites cellules dans un milieu de culture contenant ladite protéine TAT.

9) Méthode selon la revendication 8, caractérisée en ce que l'on induit la transcription de l'ARNi en cultivant les cellules eucaryotes dans un
10 milieu ne contenant pas de protéine TAT.

10) Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que l'on introduit la protéine TAT dans les cellules eucaryotes en introduisant dans lesdites cellules un vecteur inducible comprenant une séquence nucléotidique codant pour la protéine TAT.

15 11) Méthode selon la revendication 10, caractérisée en ce que l'on induit la transcription de l'ARNi en bloquant la synthèse de la protéine TAT.

12) Un acide nucléique tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 6.

13) Une cellule ou une lignée de cellules transfectées par un acide
20 nucléique selon la revendication 12.

14) Composition notamment pharmaceutique comprenant comme substance active au moins un acide nucléique selon la revendication 12 ou une cellule ou lignée de cellules selon la revendication 13, éventuellement associée dans la composition à un excipient compatible.

1/1

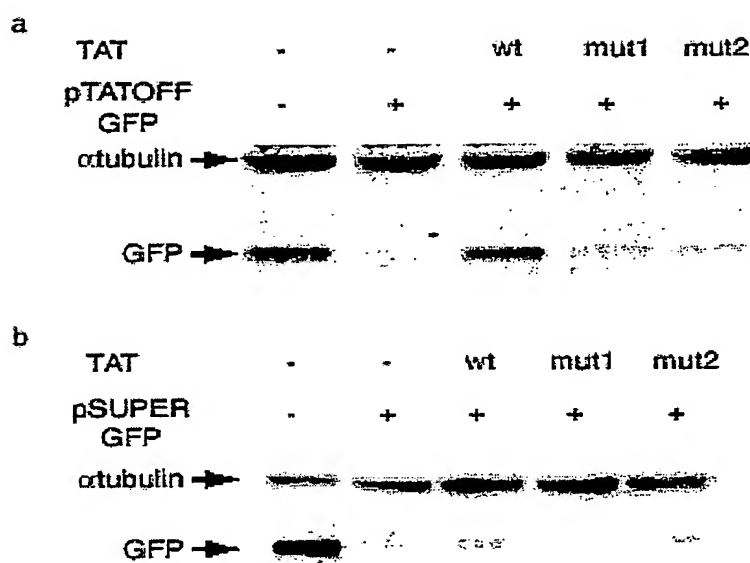


Figure 1

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)

SEQUENCE LISTING

<110> Centre National de la Recherche Scientifique -CNRS -

<120> Méthode d'induction d'une activité ARNi spécifique dans des cellules et acides nucléiques pour sa mise en oeuvre

<130> 34284/PCT

<140> PCT/FR04/XXXXXX

<141> 2004-10-19

<150> FR 0312250

<151> 2003-10-20

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 11

<212> DNA

<213> Human immunodeficiency virus

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(11)

<223> séquence codant pour la séquence TAR minimale reconnue par la protéine TAT

<400> 1

atctgagctc t 11

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> unidentified

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(20)

<223> séquence codant pour le siRNA antisens de la GFP

<400> 2

gcaagctgac cctgaagttc 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> unidentified

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(20)

<223> séquence codant pour le siRNA sens de la GFP

<400> 3
gaacttcagg gtcagcttgc

20

<210> 4
<211> 51
<212> DNA
<213> unidentified

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(51)
<223> séquence du shRNAGFP

<400> 4
gcaagctgac cctgaagttc atctgagctc tgaacttcag ggtcagcttg c

51

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR2004/002673

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 C12N15/63 C12N15/11 C12N5/10 A61K31/713		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 C12N A61K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	MATSUKURA S ET AL: "Establishment of conditional vectors for hairpin siRNA knockdowns" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 31, no. 15, 1 août 2003 (2003-08-01), page e77, XP002270940 ISSN: 0305-1048 le document en entier -----	1-14
A	WO 02/059300 A (FANNING GREGORY C ; J & J RES PTY LTD (AU); SYMONDS GEOFF (AU); ARNDT) 1 août 2002 (2002-08-01) le document en entier ----- <div style="text-align: center;">-/-</div>	1-14
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>*A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>*E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>*L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>*O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>*P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>*X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>*Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>*Z* document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center; font-weight: bold;">15 mars 2005</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center; font-weight: bold;">24/03/2005</div>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Andres, S</div>

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR2004/002673

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>ALLIKIAN MICHAEL J ET AL: "Doxycycline-induced expression of sense and inverted-repeat constructs modulates phosphogluconate mutase (Pgm) gene expression in adult Drosophila melanogaster." GENOME BIOLOGY, vol. 3, no. 5, 15 avril 2002 (2002-04-15), pages RESEARCH0021 1-0021 10, XP002282710 ISSN: 1465-6914 le document en entier</p>	1-14
T	<p>FRITSCH LAURIANE ET AL: "Conditional gene knock-down by CRE-dependent short interfering RNAs." EMBO REPORTS, vol. 5, no. 2, février 2004 (2004-02), pages 178-182, XP002275072 ISSN: 1469-221X</p>	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR2004/002673

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 02059300 A	01-08-2002	CA 2433680 A1	01-08-2002
		EP 1354038 A2	22-10-2003
		JP 2004532616 T	28-10-2004
		WO 02059300 A2	01-08-2002
		US 2002160393 A1	31-10-2002

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2004/002673

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/63 C12N15/11 C12N5/10 A61K31/713

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MATSUKURA S ET AL: "Establishment of conditional vectors for hairpin siRNA knockdowns" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 31, no. 15, 1 August 2003 (2003-08-01), page e77, XP002270940 ISSN: 0305-1048 the whole document	1-14
A	WO 02/059300 A (FANNING GREGORY C ; J & J RES PTY LTD (AU); SYMONDS GEOFF (AU); ARNDT) 1 August 2002 (2002-08-01) the whole document ----- -/--	1-14

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 March 2005

Date of mailing of the international search report

24/03/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Andres, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2004/002673

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>ALLIKIAN MICHAEL J ET AL: "Doxycycline-induced expression of sense and inverted-repeat constructs modulates phosphogluconate mutase (Pgm) gene expression in adult Drosophila melanogaster." GENOME BIOLOGY, vol. 3, no. 5, 15 April 2002 (2002-04-15), pages RESEARCH0021 1-0021 10, XP002282710 ISSN: 1465-6914 the whole document</p>	1-14
T	<p>FRITSCH LAURIANE ET AL: "Conditional gene knock-down by CRE-dependent short interfering RNAs." EMBO REPORTS, vol. 5, no. 2, February 2004 (2004-02), pages 178-182, XP002275072 ISSN: 1469-221X</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR2004/002673

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02059300	A	01-08-2002	CA 2433680 A1	01-08-2002
			EP 1354038 A2	22-10-2003
			JP 2004532616 T	28-10-2004
			WO 02059300 A2	01-08-2002
			US 2002160393 A1	31-10-2002

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)